

# ヘモグロビン変性法を中心とした界面活性剤の眼刺激性評価法の開発

著者	林 俊克
号	366
発行年	1995
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15794">http://hdl.handle.net/10097/15794</a>

氏 名（本籍）                      <sup>はやし</sup>林                      <sup>とし</sup>俊                      <sup>かつ</sup>克

学 位 の 種 類                      博                      士                      （ 薬                      学 ）

学 位 記 番 号                      薬                      第                      3 6 6                      号

学位授与年月日                      平 成   7   年   11   月   22   日

学位授与の要件                      学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目                      ヘモグロビン変性法を中心とした界面活性剤の眼刺激性評価法の開発

論文審査委員                      (主 査)  
教授 鈴 木   康   男                      教授 竹   内   英   夫  
教授 山   添                      康

# 論文内容要旨

現在、界面活性剤の眼刺激性の評価・判定としてはウサギを用いる Draize 法による *in vivo* 試験法が汎用されている。しかし、近年では動物愛護の観点から動物を用いない試験法の開発が社会的なニーズとなっている。このため、Draize 法に替わる多くの *in vitro* 試験法が開発されているが、いずれの試験法も動物実験の結果とはよく相関するものの、操作が簡便でない場合が多いこと、細胞培養等の高度な技術と設備を必要とすること、眼刺激性発現のメカニズムに関連した考察が少ないこと等の問題点がある。しかし、既存の代替法がタンパク質と脂質を構成要素として持つ生体膜を標的としている点に着目すれば、「界面活性剤による眼刺激は眼を構成するタンパク質の変性と脂質膜の物性の変化による膜破壊によって引き起こされる」と考えることができる。

そこで、本研究では特殊な設備を必要としない簡便な *in vitro* の眼刺激性評価試験法を開発すること及び眼刺激性発現のメカニズムに基づく科学的に妥当性の高い試験法を開発することの2点を念頭に置き以下の検討を行った。

## 1. タンパク質の変性の簡便な測定法の開発

「タンパク質の変性」の測定法としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や UV スペクトロメトリーあるいは円二色性スペクトロメトリー (CD) 等が用いられている。しかし、HPLC は処理に長時間を要するために多種類の試料の測定には適さず、また、CD によってタンパク質の2次構造の変化をみる方法は設備や操作の簡便性の点から日常試験としての実施が困難である。

そこで、本研究では可視領域に吸収ピークを持つヘモグロビンを用いてその吸光度の変化からタンパク質変性を簡便に計測する方法 (ヘモグロビン変性法, HDR 法) の開発を試みた。

HDR 法は 96 穴マイクロプレート上で 2% から 2 倍希釈法によって調製した 11 濃度水準の界面活性剤溶液とアジドメトヘモグロビン緩衝液とを 5 分間インキュベートの後、マイクロプレートリーダーにて 418nm の吸光度を測定し、各濃度水準におけるヘモグロビン変性率 (HDR%) を算出するという方法である。

まず、現在化粧品原料等に使用されている 12 種類の界面活性剤につきその Draize 法の結果と HDR 法との比較を行い、一定の濃度範囲において両者の間に 0.7 以上の高い相関係数が得られることを明らかにした。つぎに、HDR% についての界面活性剤の濃度依存性データから因子分析を行ったところ、界面活性剤の濃度の高低によって異なる 2 つの因子が抽出された。これらは共にヘモグロビンの変性機構に関与するものである。さらに、両因子を合理的に組み合わせるために重回帰分析を行った結果、Draize 法における角膜スコア (Dc) 及びトータルスコア (Dt) と HDR% との関係は次式で表すことができた。

$$Dc = 9.504 + 0.898 \times \text{HDR\% at 2\%}$$

$$- 0.667 \times \text{HDR\% at 1\%} + 0.494 \times \text{HDR\% at 0.125\%}$$

$$Dt = 14.922 + 0.686 \times \text{HDR\% at 2\%} + 0.496 \times \text{HDR\% at 0.063\%}$$

これらの線形結合式によって、高濃度活性剤域及び低濃度活性剤域の相関係数を、それぞれ、 $r=0.878$  及び  $r=0.861$  まで向上させることができた。以上の結果より、特定濃度での単相関においても HDR 法は Draize 法の代替法となりうること、また重回帰式を導入することでさらに推定精度を向上できることが明らかとなった。

## 2. 細胞膜破壊の簡便な測定法の開発

細胞膜に対する障害性から眼刺激性を評価する方法としては、ウサギの角膜由来細胞（SIRC 細胞）を用いる方法、ヒト子宮頸ガン由来細胞（HeLa 細胞）を用いる方法、赤血球（RBC）の溶血の度合いを指標とする方法及び有精鶏卵の漿尿膜（CAM）の損傷の程度を評価する方法等がある。また、人工膜に対する膜破壊反応から評価する方法としては、牛の角膜脂質から調製したリポソームの破壊の度合いを指標とする試験法（リポソーム法）が報告されている。

そこで、いずれの方法が細胞膜の破壊の簡便な測定法として最適であるかを明らかにするために、同様に 12 種類の界面活性剤について上記の 5 種類及び HDR 法とソラマメ抽出タンパク水溶液の濁度を指標として眼刺激性を評価する EYTEX 法の計 7 種類の *in vitro* 試験法を実施し、それらの結果を因子分析により解析した。

その結果、各試験法の因子負荷量の大きさから推測して、1) 細胞膜破壊に関する因子、2) HDR 法に関するタンパク変性に関連する因子、3) EYTEX 法に関するタンパク変性に関連する因子及び 4) 細胞毒性試験に関連する因子の 4 つが抽出された。またこれらの結果より、Draize 法に関連する脂質膜の破壊を簡便に測る方法としてはリポソーム法及び RBC 法が適切であることを明らかにした。

さらに、Draize 法はタンパク変性因子と細胞膜破壊因子との複合作用によって説明できることが示唆され、界面活性剤によって発現する眼刺激性はこれら 2 つの因子によると推察できた。

## 3. バッテリーシステムの開発による推定の向上

前述の因子分析の結果より、HDR 法とリポソーム法あるいは RBC 法とを組み合わせることにより Draize 法を再現できることが推察できた。そこで、重回帰分析の手法によりそれらの試験法を合理的に組み合わせるバッテリーシステムを構築し、Draize スコアの推定精度を上げる検討を行った。

HDR 法とリポソーム法の組み合わせについては、HDR%とリポソームを 50%破壊する濃度（LIPO）を組み合わせた次第が得られた。

$$Dc=16.769-0.011\times LIPO+0.896\times HDR\% \text{ at } 2\%$$

$$-0.659\times HDR\% \text{ at } 1\%+0.341\times HDR\% \text{ at } 0.063\%$$

この線形結合式によって角膜スコアに相関するスコアが得られた ( $r=0.922$ )、また、HDR 法と RBC 法の組み合わせについては、HDR%と RBC を 50%溶血させる界面活性剤濃度（RBC）を組み合わせた次式が得られた。

$$Dt=30.877-0.025\times RBC+0.671\times HDR\% \text{ at } 2\%$$

$$-1.774\times HDR\% \text{ at } 0.125\%+1.960\times HDR\% \text{ at } 0.063\%$$

この式より、トータルスコアに相関するスコアが得られた ( $r=0.941$ )。

以上のバッテリーシステムと Draize 法のスコアとの相関係数は実用上十分に高いので、Draize 法を代替する実用的な方法が開発できたといえる。

#### 4. ヘモグロビン変性の物理化学

ここで、HDR 法の物理化学的な根拠を明確にするため、強い眼刺激性を示すことが知られているラウリル硫酸ナトリウム (SDS) と穏和な刺激性を示すラウロイルメチルタウリンナトリウム (LMT) の 2 種類のアニオン界面活性剤によって引き起こされるヘモグロビン変性について検討した。方法としては CD スペクトルの観測によるメトヘモグロビンの 2 次構造の変化、HPLC による変性成分の分析及び界面活性剤のメトヘモグロビンに対する吸着量を測定し、HDR% と 2 次構造との間の相関性を解析した。

各々の試験法により得られたデータに対して相関分析及び因子分析を行った結果、界面活性剤のメトヘモグロビンへの吸着量、HDR%、ヘトヘモグロビン中の  $\alpha$ -ヘリックス含量の減少及びランダム構造含量の増加との間には、互いに高い相関がみられた。また、ヘトヘモグロビンの変性過程は 2 種類存在し、 $\alpha$ -ヘリックスの崩壊と  $\beta$ -構造の変化が認められた。これらの 2 次構造の変化はヘムグループの周辺の変化 (電子状態の変化) に関連しており、 $\alpha$ -ヘリックスの崩壊がアニオン界面活性剤の刺激性発現の原因の 1 つである可能性が示唆された。

したがって、HDR 法は界面活性剤によって引き起こされるメトヘモグロビンの  $\alpha$ -ヘリックスのランダム構造化によって起こるヘム周辺の変化を間接的に測定する試験法であると考えられる。また、ヘモグロビン変性を引き起こす要因としては、 $\alpha$ -ヘリックスの崩壊 (ランダム化) と  $\beta$ -構造の変化が考えられ、これは HDR 法で示されたヘモグロビンの変性に関与する因子は 2 つあるという考察と一致した。さらに、 $\alpha$ -ヘリックスの崩壊に関して SDS は全ての界面活性剤濃度で LMT よりも作用が強いことが明らかとなり、SDS が LMT よりも眼刺激性が強いという事実とよく一致した。

#### 5. 化学構造からの眼刺激性の予測

HDR 法によって求めた 21 種類の界面活性剤についての眼刺激性のトータルスコアを目的変数とし、それら界面活性剤の化学構造の特徴を末端親水基、対イオン及び分子内の末端以外の親水性原子団の 3 要因に分類し、構造活性相関を数量化理論 I 類を用いて解析した。その結果、界面活性剤の化学構造上の特徴と HDR 法によって推定されるトータルスコアの間には相関係数 0.92 という高い相関性が存在することが示された。末端親水基の違いに関しては、カルボキシル基 ( $-\text{COOH}$ ) とスルホン酸基 ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) を同一分子内に持つ非相同の界面活性剤が最も刺激性が弱く、その他の親水性原子団の存在はさほど眼刺激性の低減には貢献しないことが示唆された。また、対イオンについては、いずれも大きな影響力を持たないが、Na よりもトリエタノールアミン (TEA) の方が若干刺激性を弱めると考えられた。

その他の分子内親水性原子団については、アミド結合 ( $-\text{CONH}-$ ) とエチレンオキサイド鎖 ( $-\text{EO}-$  鎖) を同時に分子内に持つ界面活性剤が最も刺激が低く、次いで良好なのは N-メチルアミド結合 ( $-\text{C}$

ON(CH<sub>3</sub>)-)を持つものであることが示された。逆に、末端に親水性のリン酸基 (-PO<sub>3</sub>H) を持つものや、分子内親水性原子団としてエステル結合 (-COO-) と -EO-鎖を同時に持つ界面活性剤及び -COO- や -CONH- を持つものは刺激性を強める傾向にあることが示唆された。この構造活性相関を利用することにより、界面活性剤の眼刺激性を推定することができると思われ、低刺激性の界面活性剤の分子設計が可能となる。

以上のことから、本研究によって実用に足る水準の簡便で科学的に妥当性の高い *in vitro* の眼刺激性評価試験法を開発することができ、更に、低刺激性界面活性剤の設計論が提案できた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

薬物の安全性を確保するためには、適切な毒性試験法の選択が必要である。現在界面活性剤の眼刺激性の試験としては、兎の角膜に対する反応を観察する Draize 法が利用されているが、多数の動物を必要とするなど問題点が多い。

本研究は、「界面活性剤の眼刺激性は眼を構成するタンパク質に対する変性作用と眼の細胞膜に対する破壊作用の両作用の組み合わせによって引き起こされる」と考え、これを具体化する実験系を構築した。すなわち、タンパク質としては入手が容易なヘモグロビン（アジドメトヘモグロビン）を選び、変性の有無を *soret* 帯の吸収スペクトルの変化から評価数値化した。また細胞膜の破壊作用は、人工脂質小胞リポソームからの内容物の流出反応から数値化している。またこれらの数値の他、現在安全性の評価に用いられている種々の試験法で得られた数値をパラメーターとし、眼刺激性を目的変数とする多変量解析を行った。

その結果、まず Draize 法のスコアとヘモグロビン変性法で得られた数値の間には高い相関性のあることを明らかにした。またこの変性は界面活性剤の濃度に依存する 2 種類の異なる機構で発現することを示し、眼刺激性は、高濃度領域の変性と低濃度領域の変性それぞれのパラメーターにより予測できることを明らかにした。

次に種々の試験法から求めたパラメーターを解析すると、Draize 法スコアは細胞膜破壊性の因子、ヘモグロビン変性因子、EYTEX 試験因子および培養細胞毒性試験に関連する 4 種類から構成され、これらを組み合わせることにより、眼刺激性試験の精度を高めることができることが分かった。また赤血球膜およびリポソーム膜破壊試験は、細胞膜破壊性試験として優れていることを示した。

次に *soret* 帯吸収スペクトルの変化から導かれるヘモグロビンの変性がどのような分子の状態を反映しているかを知るため、界面活性剤による変性時のタンパクの CD スペクトルを測定した。その結果、主に  $\alpha$ -ヘリックスが界面活性剤によってランダム構造に変化していることが分かり、アニオン性界面活性剤の場合、この変化の程度と眼刺激性とがよく相関していることが明らかとなった。

更に今後開発される界面活性剤の眼刺激性を予測するため、末端の親水基や対イオンの種類からタンパク質の変性作用の判定を試みた。すなわち構造的特徴に対してカテゴリスコアを導き、これらを利用して計算したスコアから Draize スコアを予測し、近似が可能である結果を得ている。

以上本論文は、界面活性剤の眼刺激性を判定するための動物試験の代替法としてヘモグロビン変性を利用する新しい方法を示しており、この領域の研究の今後の発展に寄与し得る内容を含み、博士（薬学）の学位論文として合格と認める。